

令和元年6月3日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08169

研究課題名(和文) 外分泌細胞における、小胞体膜KCa1.1チャネルの生理的、病理的役割

研究課題名(英文) Physiological role of KCa1.1 channel in ER membrane

研究代表者

村田 喜理 (Murata, Yoshimichi)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：60455780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、外分泌細胞における小胞体イオンチャネルの役割を明らかにすることを目的とした。KCa1.1、Kv1.2など一部のK⁺チャネルが存在するHEK293細胞では、それらを発現していない細胞に比べて小胞体内のCa²⁺濃度が高く維持されていることを見いだした。KCa1.1チャネルの阻害薬、Kv1.2のイオン透過性を消失させた変異体を用いた実験の結果から、この現象にK⁺イオンの透過は必須ではないことが示唆された。pHイメージングにより、小胞体内のpH環境の制御機構に関する研究も行い、ER内pH変化の観察手法の確立に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、神経疾患や糖尿病、急性膵炎などの疾患に小胞体の機能異常が関与することが明らかになるなど、小胞体の生理的、病理的役割が注目されている。しかし、小胞体内のイオン環境に着目した研究はほとんどない。本研究では、K⁺チャネルにより(イオン透過を介さずに)小胞体Ca²⁺イオン濃度が変化するという現象の発見、ER内pH変化の観察手法の確立などに至った。これらの成果は、ER内のイオン環境研究の端緒となり、小胞体機能のさらなる理解、生理的・病理的役割の解明に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：Ion channels working at plasma membrane are assembled in endoplasmic reticulum, then they are transported to their destination via Golgi apparatus. But it is unclear that whether they are conferred any function(s) and physiological role(s) in the intracellular membrane.

We observed large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (MaxiK) currents in nuclear envelopes (peri-nuclear ER membrane) of pancreatic acinar cells and HEK293 cells using the patch-clamp technique. Consequently we tried to elucidate role(s) of this channel in ER membrane. We evaluated alteration in free Ca²⁺ content in the ER expressing MaxiK channel and indicated that MaxiK-expressing HEK293 cells have larger Ca²⁺ content in ER than wild type HEK293 cells.

研究分野：一般生理学

キーワード：イオンチャネル 小胞体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経疾患や糖尿病、急性膵炎、シェーグレン症候群における唾液腺などの外分泌異常など様々な疾患に、小胞体の Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれる現象が関連する事が明らかとなり、小胞体の生理的・病理的役割が注目されていた。

申請者が所属する研究室では、マウスの膵臓腺房細胞から、小胞体膜を含む nuclear envelope (NE) を単離し、それに patch clamp 法を適用することにより、小胞体中のイオンチャネルから電流を記録する独自の技術が確立されている。その技術を用いて、マウス膵臓腺房細胞や培養細胞 (human embryonic kidney293; HEK293 細胞) の NE において、Ca²⁺依存性の電位依存性 K⁺ (K_{Ca}1.1) チャネルをはじめとした、最終的に形質膜に輸送されるいくつかのイオンチャネルが、小胞体膜中ですでにチャネル活性を獲得していることが示されていた。

小胞体に対する注目度が増す中で、小胞体内のイオン環境に着目した研究はほとんど行われていない状態であり、小胞体膜中のイオンチャネル活性が生理学的・病理学的に果たす役割はほぼ未解明のまま残されていた。(その状況は現在もそれほど変化していない。)

2. 研究の目的

我々は独自の研究から、Ca²⁺依存性の電位依存性 K⁺ (K_{Ca}1.1) チャネルをはじめとした、最終的に形質膜に輸送される少なくとも一部のイオンチャネルが、小胞体内ですでに機能を獲得していることを見出している。本研究では、それらイオンチャネル活性の小胞体機能への寄与について解明することを目的とした。

具体的には、小胞体の重要な機能として知られている、Ca²⁺ハンドリング、Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれる現象にたいして、小胞体中の K_{Ca}1.1 チャネルをはじめとするイオンチャネルの有無が与える影響を調査するために、以下の 1) から 4) の事柄を明らかにすることを試みた。(1) 定常状態の細胞の中で、小胞体膜中の K_{Ca}1.1 チャネルが担う役割を検討する。(2) whole の細胞において カルシウムシグナリング、UPR などの小胞体で起こる生理的現象への、小胞体中の K_{Ca}1.1 の関与、影響を評価する。(3) (2) で得られた結果をもとに、単一の nuclear envelope における、K⁺イオン、Cl⁻イオンの濃度変化の蛍光イメージングや電気生理学的記録などにより、さらに詳細な解析を行う。(4) (1)~(3) で K_{Ca}1.1 の関与が疑われた現象について、外分泌細胞を用いた解析を行う。

3. 研究の方法

本研究では、以下の(1)から(4)の事柄を明らかにすることにより、K_{Ca}1.1 チャネルをはじめとするイオンチャネルがもつ小胞体中のチャネル活性の、小胞体膜における生理的・病理的役割を明らかにすることを目的とする。

- (1) 定常状態の細胞の中で、小胞体膜中の K_{Ca}1.1 チャネルが担う役割を検討する。
- (2) whole の細胞において カルシウムシグナリング、UPR などの小胞体で起こる生理的現象への、小胞体中の K_{Ca}1.1 の関与、影響を評価する。
- (3) (2) で得られた結果をもとに、単一の nuclear envelope における、K⁺イオン、Cl⁻イオンの濃度変化の蛍光イメージングや電気生理学的記録などにより、さらに詳細な解析を行う。
- (4) (1)~(3) で K_{Ca}1.1 の関与が疑われた現象について、外分泌細胞を用いた解析を行う。

具体的な実験は、最初に(1) whole の細胞において、K_{Ca}1.1 の発現の有無により、小胞体の Ca²⁺シグナリングに差異があるかどうかを比較し、K_{Ca}1.1 が小胞体に与える影響を検討した。まず、小胞体膜に発現するタンパク質性の蛍光 Ca²⁺センサー (G-CEPIAer; Suzuki ら、2018) を用いて、K_{Ca}1.1 チャネルの発現の有無による小胞体における Ca²⁺シグナリングの差異を検討した。まず、HEK293 細胞で内因性に発現が知られている P2Y 受容体を用いて三量体 G タンパク質刺激を行い、Gaq 経路を介した Ca²⁺シグナリングに伴う、小胞体の Ca²⁺濃度の変化を蛍光イメージングにより観察した。また、K_v1.2、K_{ir}2.1、K_{Ca}2.1、K_{Ca}3.1 など種々の K⁺チャネルにおいても同様の実験を行った。次に、Ca²⁺シグナリングに変化の見られた K_{Ca}1.1、K_v1.2 チャネルにおいて、各チャネルの変異体を作成し、観察された Ca²⁺シグナリングの修飾機序についての検討を行った。

次に、小胞体膜における pH の調節機構を解明するために、nuclear envelope を用いて pH イメージングを行なった。蛍光タンパク質性の pH センサー (mCherrySEpHuorin; Koivusalo ら、2010) に小胞体局在化シグナルを付加して使用した (mCherrySEpHluorinER)。mCherrySEpHluorinER を強制発現した HEK293 細胞を用いて NE を作成し、使用した。

さらに、2-ii) Unfolded Protein Response (UPR) を誘導し、K_{Ca}1.1 の有無により反応性に差があるかどうかを検討する。UPR は、tunicamycin により誘導し、ESTRAP 法 (Hiramatsu ら、2006) によりストレスの強度を測定する。また UPR の結果として起こるアポトーシスに対する抵抗性の変化などについても検討する。

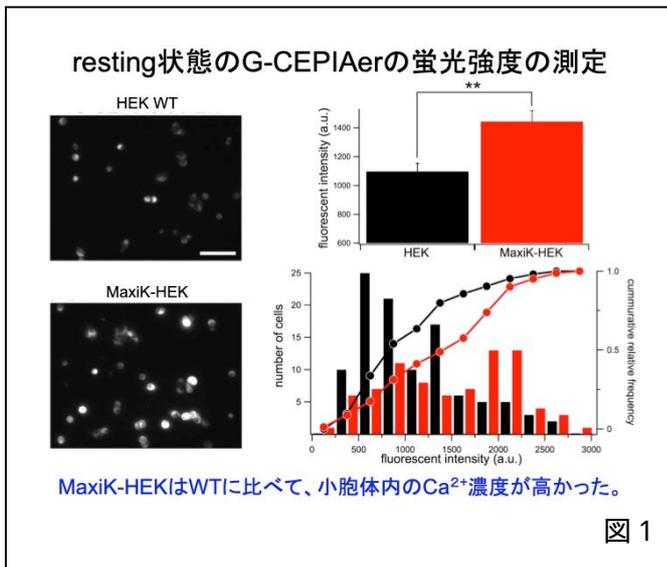
4. 研究成果

ER 膜内で K_{Ca}1.1 チャネルが果たす役割を調べる端緒として、K_{Ca}1.1 の発現の有無により、HEK293 細胞の ER における Ca²⁺ハンドリングに変化があるかどうか、タンパク質性の蛍光 Ca²⁺センサー G-CEPIAer を用いて解析を行った。HEK293 細胞で内因性に発現が知られている ATP 受容体を用いて三量体 G タンパク質刺激を行い、Gaq 経路を介した Ca²⁺シグナリングに伴う、小胞体

の Ca^{2+} 濃度の変化を蛍光イメージングにより観察した。その結果、 $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ を発現した HEK293 細胞と WT の HEK293 細胞で、受容体刺激による Ca^{2+} 放出の割合、 Ca^{2+} の再充填の kinetics などにおいて、ほとんど差は見られなかった。しかし、HEK293 細胞に $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ を発現させることにより、細胞が(刺激前に)保持している小胞体内 Ca^{2+} 濃度が WT よりも増加していることが示唆された(図1)。これは、fura-2 を用いて行なった thapsigargin 投与による小胞体からの Ca^{2+} 流出量が増加していることから確認された。この現象は、HEK293 細胞に $\text{K}_{\text{v}1.2}$ を発現させた場合は再現されたが、 $\text{K}_{\text{ir}2.1}$ 、 $\text{K}_{\text{Ca}2.1}$ 、 $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ を発現させても、小胞体内 Ca^{2+} 濃度の増加は観察されなかった。この現象は、細胞外液に K^+ チャンネルのブロッカーである TEA^+ を添加して細胞を培養した後でも観察されたことから、形質膜に存在するチャンネルの活性に依存したのではないことが示唆された。

次に、 $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ の発現による、stable な状態の細胞での小胞体内の Ca^{2+} 濃度上昇の機序を解明するために、 $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ 、 $\text{K}_{\text{v}1.2}$ において種々の変異体を作成しそれら変異体について、小胞体の Ca^{2+} 濃度上昇能の有無を検討した。その結果、 $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ の Ca^{2+} 感受性を欠失した変異体でも、小胞体内 Ca^{2+} 濃度の増加が再現されたことから、 $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ の Ca^{2+} 感受性は、この現象に関与していないことが示唆された。次に、 $\text{K}_{\text{v}1.2}$ のチャンネル活性を欠失した変異体を用いた実験、および $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ 特異的な脂溶性の阻害薬(細胞外からの投与により形質膜、細胞内膜に存在する $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ を阻害すると考えられる)を用いた実験を行なったところ、驚いたことに、このチャンネル活性を失っていると考えられる状態においても、小胞体内 Ca^{2+} 濃度の増加が再現されていた。この結果は、 $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ 、 $\text{K}_{\text{v}1.2}$ チャンネルによる小胞体内 Ca^{2+} 濃度の増加が両チャンネルのイオン透過性非依存的に起こっていることを示唆している。イオンチャンネルの発現により小胞体内の Ca^{2+} 濃度の変化は現在まで知られておらず、また小胞体内の Ca^{2+} 濃度がどのように設定されているのか、それがどのように制御されているのかも未解明な点が多く、今回我々が発見した現象は、非常に興味深い。さらにイオンチャンネルタンパク質の、イオン透過以外の役割はほとんど報告がなく、我々が発見した現象はそういった点からも興味深く、今後 $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$ 、 $\text{K}_{\text{v}1.2}$ による小胞体内の Ca^{2+} 上昇の機序について、解析を進める予定である。

また我々は、小胞体膜における pH の調節機構を解明するために、nuclear envelope を用いて pH イメージングを行なった。蛍光タンパク質性の pH センサー (mCherrySEpHuorin) に小胞体局在化シグナルを付加して使用した(mCherrySEpHluorinER) mCherrySEpHluorinER を強制発現した HEK293 細胞を用いて NE を作成し、イメージングを行なった。NE の外側 (cytoplasm 側) を灌流し、pH を変化させると、NE の lumen 内でも膜外の pH 変化と同方向の変化 (外側の pH が低下すれば低下、上昇すれば上昇) が観察された。細胞内膜 lumen 内の pH は v-ATPase によるプロトン輸送により調節されていると考えられているが、小胞体で v-ATPase が働いているという報告は見られない。小胞体膜におけるプロトン輸送の機序は未知の部分が多いため、今後解明を進める予定である。



引用文献

Junji Suzuki,1 Kazunori Kanemaru,1 Kuniaki Ishii,2 Masamichi Ohkura,3 Yohei Okubo,1 and Masamitsu Inoue,1

Imaging intraorganellar Ca^{2+} at subcellular resolution using CEPIA
Nat Commun. 5: 4153 (2014).

Mirkka Koivusalo, Christopher Welch, Hisayoshi Hayashi, Cameron C. Scott, Moshe Kim, Todd Alexander, Nicolas Touret, Klaus M. Hahn, and Sergio Grinstein

Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling
J Cell Biol 188: 547-563 (2010)

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計6件)

- 1、村田喜理、丸山芳夫
ATP dependent H⁺ transport in endoplasmic reticulum membrane
FAOPS2019(国際学会)
2019年
神戸コンベンションセンター(兵庫県神戸市)
- 2、村田喜理、丸山芳夫
ATP dependent proton transport in endoplasmic reticulum
第49回生理研国際シンポジウム Ion channels: looking back, seeing ahead(国際学会)
2018年
岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市)
- 3、村田喜理、丸山芳夫
K⁺チャンネルの小胞体膜における機能の解明
第3回イオンチャンネル研究会
2018年
福井市総合ボランティアセンター(福井県福井市)
- 4、村田喜理
小胞体中存在するK⁺チャンネルによる小胞体Ca²⁺ストアの増加
第13回TRPチャンネル研究会
(招待講演)
2017年
岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市)
- 5、村田喜理
Evaluation of alteration in the endoplasmic reticulum function with MaxiK channels
第94回日本生理学会大会
2017年03月29日~2017年03月29日
アクトシティ浜松(静岡県浜松市)
- 6、村田喜理、風間逸郎、丸山芳夫
Evaluation of alteration in intracellular Ca²⁺ mobilization with MaxiK channels in the endoplasmic reticulum
第93回日本生理学会大会
2016年03月24日~2016年03月24日
札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：丸山 芳夫

ローマ字氏名：Yoshio Maruyama

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。